

Mikilvægi bættra aðferða við greiningu Alzheimer sjúkdómsins

Sigurveig Gunnarsdóttir
(MSc Pharmacology, Oxon)

Vísindamaður (Research Scientist)
Lyfjapróunarsvið (Drug Discovery)
Íslensk erfðagreining (DeCODE Genetics)

Lykillorð

Alzheimer, greiningaraðferðir, lífmerki

Höfundur hlaut styrk úr Vísindasjóði Öldrunarfræðafélagsins árið 2005.

Greinargerð þessi mun einnig birtast í fréttabréfinu FAASfréttir.

Alzheimer er taugahrörnunarsjúkdómur sem leggst á heila sjúklinga og leiðir til breytinga s.s á minni, hegðun og persónuleika. Í heila sjúklinga koma fram breytingar sem nefndar eru skellur (e. plaques) og flækjur (e. tangles) og er taugafrumudauði mikill þar sem þessar breytingar eru. Nokkrar stökkbreytingar hafa verið tengdar við Alzheimer sjúkdóminn en þær geta aðeins skýrt lítinn hluta Alzheimer tilfella. Núverandi lyfjameðferðir við Alzheimer sjúkdómnum geta hægt



á eða minnkað einkenni sjúkdómsins tímabundið en geta hvorki stoppað né breytt framvindu sjúkdómsins. Greining á Alzheimer sjúkdómnum byggir mest á að greina einkenni sjúkdómsins en talið er að fyrstu stig hans byrji mörgum árum áður en einkenna verður vart. Þetta þýðir að sjúkdómurinn greinist ekki fyrr en verulegar skemmdir hafa orðið á heila sjúklinga vegna taugafrumudauða og skellumyndunar. Mikilvægi rannsókna og þróunar á betri aðferðum við greiningu Alzheimer sjúkdómsins sem geta greint sjúkdóminn á fyrstu stigum hans er því ótvírætt.

Inngangur

Alzheimer sjúkdómurinn er taugahrörnunarsjúkdómur sem leggst á heila sjúklinga. Taugafrumur í heila sjúklinga missa tengslin á milli sín og deyja en taugafrumudauðinn er staðbundinn á fyrstu stigum sjúkdómsins^{1,2}. Þegar sjúkdómurinn þróast verður taugafrumudauði einnig í öðrum svæðum heilans³ og leiðir þetta síðan til breytinga s.s. á minni, hegðun og persónuleika. Algengi sjúkdómsins eykst með aldri⁴ en sjúkdómurinn getur einnig komið fram á miðjum aldri.

Í heila sjúklinga koma fram breytingar sem nefndar eru skellur (e. plaques) og flækjur (e. tangles). Við venjuleg efnaskipti er amyloid precursor prótein (APP) klofið með ensimunum α - og β -secretase og síðan með γ -secretase. Þegar β - og γ -secretase kljúfa APP þá myndast afurðin β -amyloid₄₂ (A β) sem er mjög óstöðug og líkleg til að mynda skellur⁵. Líkaminn brýtur A β niður⁶ og hreinsar úr heilanum⁷ en samt sem áður þá finnst skellur í litlum mæli í heila heilbrigðra aldraðra einstaklinga^{8,9}. Líklegt þykir að framleiðsla á A β í heila Alzheimer sjúklinga sé mun meiri en sú hreinsun sem verður á A β úr heilanum. Þetta ójafnvægi er síðan talið leiða til aukningar á skellumyndun og taugafrumudauða í ákveðnum svæðum í heila sjúklinga og þannig til minnisglapa¹. Flækjur (e. tangles) verða hins vegar til vegna of mikillar fosforyleringar (e. hyperphosphorylation) á



Greinarhöfundur lengst til vinstri, við tilraunastörf í Háskólanum í Oxford.

próteini sem kallast tau^{10,11}. Sýnt hefur verið fram á að dauði taugafruma er mikill þar sem flækjurnar eru¹².

Nokkrar stökkbreytingar í genum hafa verið tengdar við Alzheimer sjúkdóminn. Stökkbreytingar í APP, presenilin 1 og presenilin 2 genunum eiga það sameiginlegt að leiða til aukningar á Aβ sem gæti skýrt aukna skellumyndun í Alzheimer sjúkdómnum¹³. Þessar stökkbreytingar eru mjög óalgengar en þær leiða til þess að einstaklingar fá sjúkdóminn fyrr en ella¹³. Einnig hefur verið sýnt fram á að apolipoprótein E (ApoE) ε4 arfgerðin auki líkurnar á því að fá Alzheimer sjúkdóminn^{13,14,15} og að arfhreindir einstaklingar (þ.e. þeir sem erfir hafa ε4 frá báðum foreldrum) séu ennþá líklegri til að fá sjúkdóminn¹⁶. En ApoE ε4 arfgerðin getur ekki sagt til um það hvort einstaklingur fái sjúkdóminn. Til eru dæmi þess að arfhreindir einstaklingar veikist ekki og einnig eru til sjúklingar sem ekki bera þessa arfgerð⁸.

Til eru tveir flokkar af lyfjum við meðferð á Alzheimer sjúkdómnum, annars vegar acetylcholinesterase hindri (e. acetylcholinesterase inhibitor) (donepezil, rivastigmine, galanthamine og tracin) sem hindra niðurbrot á taugaboðefninu acetylcholine og hindri á N-methyl-D-aspartate (NMDA) viðtakann (NMDA antagonist) (memantine). Lyfin hægja á eða minnka einkenni sjúkdómsins tímabundið en þau geta hvorki stoppað né breytt framvindu hans^{17,18}. Auk þess virka þessi lyf betur á frumstigum sjúkdómsins. Mikið hefur verið lagt upp úr því að þróa ný lyf við Alzheimer sjúkdómnum sem minnka Aβ birgði heilans með því að hindra Aβ framleiðslu í heila og samsöfnun eða auka útskilnað á Aβ úr heila¹. Meðal þeirra lyfja sem eru í þróun eru lyf sem hindra β-secretase annars vegar og γ-secretase hins vegar en þau valda því að APP er ekki brotið niður í Aβ^{1,17}.

Alzheimer sjúkdómurinn er flókinn sjúkdómur og erfitt hefur reynst að meðhöndla hann. Greining á sjúkdómnum byggir mest á því að greina einkenni sem koma fram í daglegum athöfnum og minni og útiloka að einkennin stafi af öðrum orsökum en Alzheimer sjúkdómnum. Þetta er mjög slæmt því talið er að fyrstu stig sjúkdómsins byrji mörgum árum áður en einkenna

verður vart¹. Þetta þýðir að sjúkdómurinn greinist ekki fyrr en verulegar skemmdir hafa orðið á heila sjúklinga vegna taugafrumudauða og skellumyndunar. Mikilvægi þess að geta greint Alzheimer sjúkdóminn á fyrstu stigi og greina hann frá öðrum sjúkdómum, til að mynda þar sem minnisglöp (e. dementias) koma við sögu, svo og frá heilbrigðum öldruðum einstaklingum er því ótvírátt. Með þessu opnast möguleikinn á því að reyna að þróa meðferðir sem eru fyrirbyggjandi eða jafnvel geta hindrað framgöngu sjúkdómsins í stað þess að vinna eingöngu á einkennum sjúkdómsins eins og núverandi meðferðir gera.

Í þessari greinargerð verða kynntar fjórar valdar aðferðir til að greina annars vegar byggingu (e. structural imaging) heilans og hins vegar virkni (e. functional imaging) hans í þeim tilgangi að greina Alzheimer sjúkdóminn. Einnig verða tekin dæmi um lífmerki (e. biomarkers) sem gætu hugsanlega hjálpað til við greiningu á Alzheimer sjúkdómnum á frumstigum hans.

Greiningaraðferðir á heila

Aðferðir til að greina byggingu heilans (e. structural imaging)

Computed tomography (CT) og magnetic resonance imaging (MRI) eru dæmi um aðferðir sem greina breytingar í byggingu heilans s.s. vegna taugafrumudauða.

Rannsóknarteymi sem kallast OPTIMA (The Oxford Programme to Investigate Memory and Ageing) hefur gert rannsóknir á miðlæga hluta gagnaugablaðs (e. medial temporal lobe) heilans, en á því svæði koma fyrstu breytingarnar fram. Þeir notuðu CT skann (e. temporal-lobe-oriented computed tomography (CT) scan) til að mæla minnstu þykkt svæðisins og sýndu þeir fram á að dauði taugafruma á þessu svæði er mun hraðari í heila sjúklinga með Alzheimer heldur en hjá heilbrigðum öldruðum einstaklingum^{19,20}.

Vísindamenn hafa einnig sýnt að hægt er að nota MRI skann til að mæla taugafrumudauða í svæði heilans sem nefnist dreki (e. hippocampus) með ágættri nákvæmni og greina þannig á milli Alzheimer sjúklinga og heilbrigðra aldraðra einstaklinga¹. Þó er ekki hægt að nota taugafrumudauða í dreka til að segja til um hvort einstaklingur með væga vitræna skerðingu (e. mild cognitive impairment, MCI) eigi eftir að þróa Alzheimer sjúkdóminn¹.

CT og MRI aðferðirnar greina breytingar í byggingu heilans sem þýðir að verulegur taugafrumudauði hefur átt sér stað áður en breytingar greinast. Betra væri því að nota aðferðir sem gætu greint breytingar í heilanum fyrr s.s. breytingar í virkni eða finna lífmerki (e. biomarkers) sem væru einkennandi fyrir fyrstu stig Alzheimer sjúkdómsins.

Aðferðir til að greina virkni heilans (e. functional imaging)

Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) og Positron Emission Tomography (PET) eru dæmi um aðferðir sem mæla virkni heilans og breyt

ingar í virkni, en breytingarnar koma fram snemma í sjúkdómsferli áður en byggingalegar breytingar koma fram¹⁸. Rannsóknir hafa sýnt að blóðflæði í heila einstaklinga með minnisglöf er truflað og sykkurefnaskipti minnkuð²¹.

SPECT aðferðin er notuð til að kanna blóðflæði í heila. Líkurnar aukast á því að einstaklingur sem greinist með einkennum Alzheimer sjúkdómsins sé raunverulega með sjúkdóminn ef hann greinist með minnkað blóðflæði í ákveðnum svæðum heilans í SPECT skanni⁸. Þrátt fyrir það hafa fáar rannsóknir borið saman niðurstöður úr SPECT skönnum og niðurstöður sem fást við krufningu, til að ganga úr skugga um að Alzheimer hafi verið rétta greiningin á sjúklingnum sem orsök minnisglapa⁸. Auk þess getur SPECT aðferðin ekki sagt til um það með vissu hvort um Alzheimer sjúkdóm sé að ræða þar sem minnkað blóðflæði í heila kemur einnig fram í öðrum sjúkdómum⁸. Þar að auki greinast sjúklingar með væga vitræna skerðingu oft með eðlilegt blóðflæði í þessu skanni⁸.

Í PET rannsóknum hefur ákveðið efni (18-fluorodeoxyglucose eða FDG) verið notað til að greina breytingar í sykkurefnaskiptum í heila Alzheimer sjúklinga^{17,21}. FDG-PET getur með mikilli nákvæmni greint Alzheimer sjúklinga frá heilbrigðu öldruðu fólki sem ekki þjáist af minnisglöpum²¹. Tekist hefur með nokkurri vissu að greina Alzheimer frá einni annarri gerð minnisglapa (e. fronto temporal dementia, FTD) með FDG-PET aðferðinni en ekki gengur jafn vel að aðgreina Alzheimer frá öðrum gerðum minnisglapa^{1,21}.

Einstaklingar sem ekki þjáast af minnisglöpum en bera ApoE ε4 breytileikann hafa greinst með minnkuð efnaskipti í ákveðnum hluta heilans með PET skanni miðað við svipaða einstaklinga sem ekki bera breytileikann²². Einnig hafa rannsóknir sýnt að einstaklingar á miðjum aldri sem eru arfhreinir fyrir ApoE ε4, en sýna engin einkenni minnisglapa, hafa hægari efnaskipti í sömu svæðum heilans og einstaklingar sem greinst hafa með Alzheimer sjúkdóminn²³. Þessar rannsóknir eru þó á frumstigi þar sem einstaklingum hefur ekki verið fylgt eftir til að sjá hvaða einstaklingar greinast með Alzheimer sjúkdóminn¹⁷.

Þróuð hafa verið efni sem geta með hjálp PET greint Aβ skellur í heila lifandi einstaklinga¹⁸. Þó ber að hafa í huga að skellur er einnig að finna í heilbrigðum einstaklingum sem ekki þjáast af Alzheimer og í öðrum sjúkdómum^{8,9}.

Kosturinn við SPECT og PET aðferðirnar framyfir CT og MRI aðferðirnar er að þær fyrrnefndu greina frumbreytingar í virkni sem eiga sér stað í sjúkdómsferlum áður en byggingarlegar breytingar koma fram og verða sýnilegar með CT eða MRI aðferðunum¹⁸. FDG-PET aðferðin virðist þó geta greint Alzheimer með meiri vissu heldur en SPECT aðferðin.

Fleiri aðferðir hafa verið prófaðar til greiningar á Alzheimer sjúkdómnum s.s. functional magnetic resonance imaging (fMRI) og magnetic resonance spectroscopy (MRS), en ekki verður fjallað sérstaklega um þessar aðferðir. Einnig eru vísindamenn íslenska fyrirtækisins Mentis Cura að vinna að rannsóknum á greiningaraðferð við Alzheimer sjúkdómnum þar sem þeir nota heilarit (electroencepalograms, EEG) og verður áhugavert að fylgjast með niðurstöðum rannsókna þeirra.

Lífmerki

Fjöldinn allur af rannsóknum miðar að því að reyna að finna lífmerki (e. biomarkers) sem gætu greint ákveðnar frumbreytingar í heila Alzheimer sjúklinga, áður en breytingar á hegðun eða stórvægilegur taugafrumudauði hefur átt sér stað. Þessi lífmerki þurfa að vera sértæk fyrir Alzheimer sjúkdóminn og gætu þau þá, með öðrum greiningaraðferðum, hjálpað til við greiningu á sjúkdómnum og þeim einstaklingum sem eru í áhættuhópi²⁴.

Komið hefur í ljós að magn Aβ er minna í mænuvökva (e. cerebrospinal fluid, CSF) Alzheimer sjúklinga en í heilbrigðum einstaklingum en breytileiki milli rannsóknaniðurstaðna er mjög mikill²⁴. Einnig hefur reynst erfitt að greina Alzheimer frá öðrum sjúkdómum þar sem minnisglöf koma við sögu með því að nota Aβ eitt og sér²⁴. Þrátt fyrir þetta hafa rannsóknir sýnt lækun í Aβ á frumstigum Alzheimer sjúkdómsins og í einstaklingum með væga vitræna skerðingu^{25,26}. Auk þess getur lágt Aβ sagt til um hvort einstaklingar með væga vitræna skerðingu eigi eftir að fá Alzheimer sjúkdóminn²⁴.

Mikil hækkun er á heildarmagni tau próteinsins (t-tau) í mænuvökva í Alzheimer sjúklingum miðað við í heilbrigðum öldruðum einstaklingum²⁷. Hækkun á t-tau er samt einnig að finna í öðrum sjúkdómum⁸. Þrátt fyrir þetta þá virðist þetta lífmerki geta greint þá einstaklinga sem þjáast af vægri vitrænni skerðingu og eiga eftir að þróa Alzheimer sjúkdóminn með góðri vissu^{28,29}.

Tekist hefur að bæta sértækni og nákvæmni í að greina þá einstaklinga með væga vitræna skerðingu



sem síðar fá Alzheimer sjúkdóminn með því að nota niðurstöður mælinga á bæði Aβ og t-tau saman í stað þess að mæla aðeins annað þessarar lífmerkja³⁰. Þrátt fyrir það reynist erfitt að greina Alzheimer frá öðrum gerðum minnisglapa²⁴.

Mörg önnur lífmerki hafa verið rannsökuð en ekki verður rætt um þau í þessari greinargerð.

Lokaorð

Við þróun aðferða til greiningar á Alzheimer sjúkdómnum er mikilvægt að hafa í huga að aðferðin geti með mikilli vissu greint sjúkdóminn á frumstigi frá öðrum sjúkdómum og þar með talið frá öðrum tegundum minnisglapa. Aðferðin þarf því að vera sértæk og geta greint Alzheimer sjúkdóminn í mjög dreifðum hópi einstaklinga og geta greint einstaklinga í áhættuhópi. Þar sem sjúkdómurinn er flókinn er samspil mismunandi aðferða nauðsynlegt til að reyna að bæta greininguna og eru áframhaldandi rannsóknir á þessu sviði því mikilvægar.

Með bætum aðferðum við greiningu Alzheimer sjúkdómsins þar sem sjúkdómurinn greinist á frumstigum, þ.e. þegar færri taugafrumur hafa dáíð, opnast sá möguleiki að reyna að þróa meðferðir sem verka ekki einungis á einkenni sjúkdómsins heldur á fyrirbyggjandi hátt. Hugsanlegt er að ákveðnir umhverfisþættir eða lífsstíll hafi áhrif á birtingu og framvindu sjúkdómsins og með bætum greiningaraðferðum væri hægt að gera rannsóknir þar sem einstaklingum er fylgt eftir í langan tíma til að kanna þessa möguleika. Einnig er hugsanlegt að aukin vitneskja um breytingar sem verða í heila sjúklunga gæti hjálpað okkur til að þróa sértækari meðferðir við sjúkdómnum. Auk þess væri áhugavert að rannsaka frekar hvað það er sem hrindir þessari atburðarás af stað með það að leiðarljósi að þróa lyf gegn þeim þætti. Því má segja að bættar aðferðir við greiningu Alzheimer sjúkdómsins séu mjög mikilvægar fyrir framfarir í meðferð Alzheimer sjúklunga.

Heimildir

1. Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387-403.
2. Stoub, T. R., deToledo-Morrell, L., Stebbins, G. T., Leurgans, S., Bennett, D. A., & Shah, R. C. (2006). Hippocampal disconnection contributes to memory dysfunction in individuals at risk for alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 10041-10045.
3. Vandenberghe, R., & Tournay, J. (2005). Cognitive aging and alzheimer's disease. *Postgraduate Medical Journal*, 81(956), 343-352.
4. Bachman, D. L., Wolf, P. A., Linn, R. T., Knoefel, J. E., Cobb, J. L., Belanger, A. J., et al. (1993). Incidence of dementia and probable alzheimer's disease in a general population: The Framingham study. *Neurology*, 43(3 Pt 1), 515-519.
5. Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393), 322-325.
6. Carson, J. A., & Turner, A. J. (2002). Beta-amyloid catabolism: Roles for neprilysin (nep) and other metalloproteinases? *Journal of Neurochemistry*, 81(1), 1-8.
7. Tanzi, R. E., Moir, R. D., & Wagner, S. L. (2004). Clearance of alzheimer's abeta peptide: The many roads to perdition. *Neuron*, 43(5), 605-608.
8. Clark, C. M., & Karlawish, J. H. (2003). Alzheimer disease: Current

- concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies. *Annals of Internal Medicine*, 138(5), 400-410.
9. Guillozet, A. L., Weintraub, S., Mash, D. C., & Mesulam, M. M. (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Archives of Neurology*, 60(5), 729-736.
10. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913-4917.
11. Nukina, N., & Ihara, Y. (1986). One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *Journal of Biochemistry*, 99(5), 1541-1544.
12. Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R., & Barnes, C. L. (1984). Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, 225(4667), 1168-1170.
13. Cummings, J. L. (2004). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 351(1), 56-67.
14. Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., et al. (1993). Apolipoprotein e: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1977-1981.
15. Roses, A. D. (1996). Apolipoprotein e alleles as risk factors in alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine*, 47, 387-400.
16. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein e type 4 allele and the risk of alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923.
17. Chang, C. Y., & Silverman, D. H. (2004). Accuracy of early diagnosis and its impact on the management and course of alzheimer's disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4(1), 63-69.
18. Masters, C. L., Cappai, R., Barnham, K. J., & Villemagne, V. L. (2006). Molecular mechanisms for alzheimer's disease: Implications for neuroimaging and therapeutics. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1700-1725.
19. Jobst, K. A., Smith, A. D., Szatmari, M., Molyneux, A., Esiri, M. E., King, E., et al. (1992). Detection in life of confirmed alzheimer's disease using a simple measurement of medial temporal lobe atrophy by computed tomography. *Lancet*, 340(8829), 1179-1183.
20. Jobst, K. A., Smith, A. D., Szatmari, M., Esiri, M. M., Jaskowski, A., Hindley, N., et al. (1994). Rapidly progressing atrophy of medial temporal lobe in alzheimer's disease. *Lancet*, 343(8901), 829-830.
21. Jagust, W. (2004). Molecular neuroimaging in alzheimer's disease. *NeuroRx*, 1(2), 206-212.
22. Small, G. W., Mazziotta, J. C., Collins, M. T., Baxter, L. R., Phelps, M. E., Mandelkern, M. A., et al. (1995). Apolipoprotein e type 4 allele and cerebral glucose metabolism in relatives at risk for familial alzheimer disease. *Jama*, 273(12), 942-947.
23. Reiman, E. M., Caselli, R. J., Yun, L. S., Chen, K., Bandy, D., Minoshima, S., et al. (1996). Preclinical evidence of alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein e. *New England Journal of Medicine*, 334(12), 752-758.
24. Borroni, B., Di Luca, M., & Padovani, A. (2006). Predicting alzheimer dementia in mild cognitive impairment patients. Are biomarkers useful? *European Journal of Pharmacology*, 545(1), 73-80.
25. Riemenschneider, M., Schmolke, M., Lautenschlager, N., Guder, W. G., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., et al. (2000). Cerebrospinal beta-amyloid (1-42) in early alzheimer's disease: Association with apolipoprotein e genotype and cognitive decline. *Neuroscience Letters*, 284(1-2), 85-88.
26. Andreasen, N., Hesse, C., Davidsson, P., Minthon, L., Wallin, A., Winblad, B., et al. (1999). Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in alzheimer disease: Differences between early- and late-onset alzheimer disease and stability during the course of disease. *Archives of Neurology*, 56(6), 673-680.
27. Sjogren, M., Davidsson, P., Tullberg, M., Minthon, L., Wallin, A., Wikkelso, C., et al. (2001). Both total and phosphorylated tau are increased in alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 70(5), 624-630.
28. Hampel, H., Teipel, S. J., Fuchsberger, T., Andreasen, N., Wiltfang, J., Otto, M., et al. (2004). Value of csf beta-amyloid1-42 and tau as predictors of alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Molecular Psychiatry*, 9(7), 705-710.
29. Maruyama, M., Arai, H., Sugita, M., Tanji, H., Higuchi, M., Okamura, N., et al. (2001). Cerebrospinal fluid amyloid beta(1-42) levels in the mild cognitive impairment stage of alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 172(2), 433-436.
30. Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., & Minthon, L. (2006). Association between csf biomarkers and incipient alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: A follow-up study. *Lancet Neurology*, 5(3), 228-234.